

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox. ✓**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 759 166**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **97 01090**

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : G 01 N 1/30, G 01 N 33/48

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 31.01.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 07.08.98 Bulletin 98/32.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *ABX SOCIETE ANONYME — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *VERIAC SYLVIE.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : *CABINET NETTER.*

⑤④ **REACTIF DE COLORATION POUR LA DETERMINATION DE CELLULES SANGUINES.**

⑤⑦ L'invention concerne un réactif de coloration pour la  
détermination de cellules sanguines, en particulier de réticu-  
locytes, qui comprend un colorant propre à marquer les cel-  
lules après incubation ainsi qu'un additif propre à favoriser  
la pénétration du colorant dans les cellules, cet additif étant  
choisi parmi un composé ionophore, un détergent et leur  
mélange.

**FR 2 759 166 - A1**



Réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines

5

L'invention concerne les analyses biologiques et notamment les analyses de sang.

10

Elle concerne plus particulièrement un réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, du type comprenant un colorant propre à marquer les cellules après incubation.

15

On connaît déjà différents réactifs de coloration de ce genre qui permettent d'identifier et de caractériser des cellules sanguines grâce à un colorant qui permet de marquer ou colorer les cellules après incubation dans des conditions de durée et de température choisies.

20

De tels réactifs font généralement appel à un colorant fluorescent ou à un colorant non-fluorescent qui, après incubation, permet le comptage des cellules colorées. Ce comptage peut être réalisé avec une coloration manuelle au microscope, avec une coloration extérieure ou avec une

25

coloration par un appareil automatisé.

30

Le comptage automatisé s'effectue généralement par une technique dite de cytométrie de flux qui s'avère plus fiable et plus rapide qu'un comptage manuel.

35

On connaît déjà différents colorants utilisés pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, et qui peuvent être utilisés pour un comptage manuel ou automatisé.

40

Parmi ces colorants fluorescents ou non-fluorescents, on peut citer notamment la pyronine Y, l'acridine orange, la thioflavine T, le thiazole orange, le nouveau bleu de méthylène ("new methylene blue"), le bleu crésyl brillant ("brilliant cresyl blue"), etc.

Des exemples de réactifs de coloration sont décrits notamment dans les publications de Brevets suivantes : CA 2 024 166, US 5 501 954, US 4 325 706, US 5 438 003, US 5 075 556, US 4 996 040, US 4 883 867, EP 0 545 314, EP 0 545 315, EP 5 0 430 719, EP 0 215 461, EP 0 226 272 et EP 0 114 462.

Dans le cas particulier de la détermination des réticulocytes, lesquels sont des précurseurs des érythrocytes ou globules rouges matures, le colorant sert à colorer ou 10 marquer l'ARN résiduel contenu dans la cellule.

L'un des inconvénients des réactifs de coloration connus est qu'ils nécessitent un temps d'incubation élevé, ce qui rend difficile leur utilisation non seulement dans les techniques 15 manuelles, mais surtout dans les techniques automatisées.

En particulier, le thiazole orange nécessite un temps d'incubation de l'ordre de 30 minutes à la température ambiante lorsqu'il est mis à réagir avec 5 microlitres de 20 sang.

Ce temps d'incubation est beaucoup trop long pour permettre une automatisation complète du procédé.

25 L'invention a notamment pour but de surmonter les inconvénients précités.

C'est en particulier un but de l'invention de procurer un réactif de coloration pour la détermination de cellules 30 sanguines, en particulier de réticulocytes, qui permet de marquer les cellules après un temps d'incubation beaucoup plus court que les temps d'incubation autorisés par les réactifs connus.

35 C'est en particulier un but de l'invention de procurer un tel réactif de coloration qui permet d'abaisser le temps d'incubation de plusieurs minutes à plusieurs secondes.

L'invention propose à cet effet un réactif de coloration du type défini en introduction, lequel comprend en outre un additif propre à favoriser la pénétration du colorant dans la cellule, cet additif étant choisi parmi un composé ionophore,  
5 un détergent et leurs mélanges.

Ainsi, le réactif de coloration de l'invention combine un colorant à un additif particulier qui favorise l'incorporation du colorant dans la cellule et, par conséquent, diminue  
10 notablement le temps d'incubation nécessaire à la réaction du colorant avec la cellule.

Dans le cadre de l'invention, on préfère avant tout utiliser un composé ionophore, c'est-à-dire un composé susceptible de  
15 favoriser la perméabilité de la membrane cellulaire et d'amplifier les échanges trans-membranaires.

Ces ionophores sont des molécules à caractère hydrophobe qui augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire à  
20 certains ions avec une spécificité variable.

Ces ionophores sont soit des transporteurs mobiles, soit des molécules formant des canaux trans-membranaires. Ils masquent la charge de l'ion du colorant, facilitant sa pénétration  
25 dans la bi-couche lipidique de la membrane.

L'additif de l'invention peut être également choisi parmi un détergent, lequel favorise aussi la pénétration du colorant en favorisant la perméabilité de la membrane. Le détergent  
30 désorganise les structures protéiques de la membrane et favorise sa déstabilisation, ce qui contribue à une meilleure incorporation du colorant.

L'additif de l'invention peut, en variante, être un mélange  
35 d'un composé ionophore et d'un détergent.

Le composé ionophore de l'invention peut être notamment un protonophore ou un antibiotique.

Des exemples non limitatifs de composés ionophores convenant à la mise en oeuvre de l'invention sont les suivants :

- 5 - Monensine, ou acide 2-[5-éthyltétrahydro-5-[tétrahydro-3-méthyl-5-[tétrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxyméthyl)-3,5-diméthyl-2H-pyran-2-yl]-2-furyl]-2-furyl]-9-hydroxy- $\beta$ -méthoxy- $\alpha,\gamma,2,8$ -tétraméthyl-1,6-dioxaspiro[4,5]décane-7-butyrique (polyéther antibiotique de formule brute :  $C_{36}H_{62}O_{11}$ );
- 10 - Nonactine, ou 2,5,11,14,20,23,29,32-octaméthyl-4,13,22,31,37,38,39,40-octaoxapentacyclo[32.2.1.1<sup>7,10</sup>.1<sup>16,19</sup>.1<sup>25,28</sup>]-tétracontane-3,12,21,30-tétrone (macrotétrolide antibiotique de formule brute :  $C_{40}H_{64}O_{12}$ );
- 15 - 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-benzylidènemalononitrile;
- Carbonylcyanide m-chlorophénylhydrazone;
- Carbonylcyanide p-trifluorométhoxyphénylhydrazone;
- 20 - Tétrachlorosalicylanilide;
- 4,5,6,7-tétrachloro-2-trifluorométhylbenzimidazole;
- 25 - Pentachlorophénol;
- 2,4-dinitrophénol;
- Valinomycine (cyclododécaepsi-peptide, antibiotique de
- 30 formule :  $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$ );
- Salinomycine (polyéther antibiotique de formule :  $C_{42}H_{70}O_{11}$ );
- 35 - Gramicidine(S) (polypeptide de formule :  $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$ ).

Le détergent pouvant être utilisé dans le réactif de coloration de l'invention est de préférence du type non-ionique ou de type zwitterionique.

A titre d'exemples non limitatifs de détergents convenant à la mise en oeuvre de l'invention, on peut mentionner :

- 5 - des propane sulfonates, en particulier le 3-[(3-cholamido-propyl)-diméthylammonio]-1-propane-sulfonate;
- des cholamides, en particulier le N,N-bis[3-D-gluconamido-propyl]-cholamide;
- 10 - des sulfobétaïnes;
- des alkyl glucosides et alkyl maltosides;
- des polyoxyéthylène éthers;
- 15 - des polyoxyéthylène sorbitans;
- des polyglycol éthers.
- 20 Le colorant utilisable dans le réactif de coloration de l'invention est un marqueur susceptible de révéler par coloration des composés intracellulaires tels que, par exemple, les acides nucléiques de la cellule, en particulier l'ARN.
- 25 Bien que l'on préfère utiliser un colorant fluorescent, et en particulier un colorant fluorescent pour les réticulocytes, il entre également dans le cadre de l'invention de faire appel à des colorants non fluorescents.
- 30 Lorsqu'il s'agit d'un colorant fluorescent, le colorant est avantageusement excitable à une longueur d'onde comprise entre 0,1 nm et 1 nm.
- 35 De préférence, il s'agit d'un colorant excitable à la lumière bleue, en particulier à une longueur d'onde de 488 nm.

A titre d'exemples non limitatifs de colorants utilisables dans la mise en oeuvre de l'invention, on peut mentionner :



- le 3,3'-diméthylloxacarbocyanine iodure (ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2(3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure);
- 5 - le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate;
- le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonio)propyl], diiodure (commercialisé
- 10 sous la dénomination TO-PRO 1, Marque déposée par Molecular Probes);
- des styryls, en particulier le styryl 7;
- 15 - le nouveau bleu de méthylène;
- le bleu de crésyl brillant.

20 Lorsque ce colorant connu est combiné à un composé ionophore et/ou à un détergent dans des proportions choisies, il franchit rapidement la membrane de la cellule, ce qui permet de diminuer notablement le temps d'incubation et de l'amener généralement à une valeur de quelques dizaines de secondes.

25 Ainsi, dans le cas du thiazole orange, le temps d'incubation peut être amené à une valeur de l'ordre de 25 secondes, au lieu de 30 minutes à la température ambiante, lorsque le colorant est utilisé seul.

30 Le réactif de coloration de l'invention peut comporter d'autres composés ou substances que le colorant et l'additif mentionnés précédemment.

35 Ainsi, le réactif de coloration peut comprendre en outre un solvant organique, en particulier un alcool tel que le méthanol, ce qui favorise non seulement la mise en solution du colorant, mais aussi la solubilisation des lipides membranaires de la cellule.

En variante ou en complément, le réactif de coloration peut comporter en outre un sel, par exemple à base de sodium, de potassium.

- 5 Il a été constaté en effet qu'une concentration en sels induit une force dite "ionique" qui, si elle est suffisamment élevée, peut déstabiliser les membranes cellulaires en modifiant les liaisons des constituants membranaires. De plus, le sel permet d'agir sur le volume des cellules.

10

D'autres composés pouvant faire partie du réactif de l'invention comprennent un agent chélateur, en particulier l'EDTA, un conservateur et un système tampon pour maintenir le pH entre 5 et 11.

15

Le réactif-type de l'invention est une solution de coloration ou de marquage qui contient :

- un colorant à une concentration comprise entre 0,1  $\mu$ M et  
20 0,5 M

- au moins un additif choisi ci-dessous

25

<u>Composés</u>	<u>Concentrations</u>
Ionophore	0-1 M
Détergent	0-20%

- un ou plusieurs des composés énumérés ci-dessous :

30

<u>Composés</u>	<u>Concentrations</u>
Sels (NaCl/KCl)	0-1 M
Agent chélateur (EDTA)	0-100 mM
Solvant	0-15%
35 Conservateur	0-1%

- un système tampon organique ou inorganique maintenant le pH entre 5 et 11.

Un exemple de réactif de coloration selon l'invention est le suivant :

	<u>Composés</u>	<u>Concentrations</u>
5	thiazole orange	2 $\mu$ M
	valinomycine	1 $\mu$ M
	polyglycoléther	0,0003%
	NaCl	155 mM
10	EDTA	2 mM
	méthanol	1,5%

Le système tampon utilisé est un tampon phosphate ajustant le pH de la solution de coloration à valeur neutre.

15

L'invention sera maintenant expliquée en référence aux dessins annexés qui représente des images obtenues sur un cytomètre de flux et qui comparent à chaque fois l'image obtenue avec un colorant de référence et l'image obtenue avec

20

un réactif de coloration selon l'invention.

Ces images représentent la fluorescence (axe des X) et la diffraction (axe des Y). On retrouve sur chacune de ces figures, de la gauche vers la droite, respectivement, trois

25

populations : la population des globules rouges (apparaissant sous la forme d'un nuage), la population des réticulocytes (partie encadrée) et la population des leucocytes (nuage dispersé).

30

Les figures 1A et 1B représentent les images obtenues sur un cytomètre de flux FACSCAN (Marque déposée de Becton Dickinson) en utilisant le thiazole orange comme colorant.

35

La figure 1A représente l'image obtenue avec le colorant de référence. Le temps d'incubation requis est de 30 minutes à la température ambiante. Le taux de réticulocytes est de 4,55%.

La figur 1B montre l'image obtenue avec un réactif de coloration selon l'invention, qui comporte du thiazole orange en présence de ionophore. Le temps d'incubation nécessaire n'est que de 25 secondes à 35°C, le taux de réticulocytes  
5 étant de 4,89%.

Les figures 2A et 2B sont des images obtenues avec un cytomètre de flux FACSCAN en utilisant un réactif de coloration selon l'invention, qui comporte du 3,3'-diméthylcarbo-  
10 cyanine iodure en tant que colorant, en présence d'un ionophore et d'un détergent.

Les deux colorations sont réalisées à 35°C. On obtient un résultat équivalent à 5 minutes pour le colorant de référence  
15 (figure 2A) et à 30 secondes pour le réactif selon l'invention (figure 2B).

Les taux de réticulocytes des images des figures 2A et 2B sont respectivement de 1,5% et de 1,3%.  
20

Les figures 3A et 3B sont des images obtenues sur un cytomètre de flux FACSCAN avec le colorant TO-PRO 1 (Marque déposée de Molecular Probes), sous irradiation à la lumière bleue.

25 Dans le cas de la figure 3A (colorant de référence), le temps d'incubation est de 60 minutes et le taux de réticulocytes de 2,22.

Dans le cas de la figure 3B (colorant en présence de ionophore), le temps d'incubation est de 5 minutes et le taux de  
30 réticulocytes de 2,14%.

Les figures 4A et 4B représentent des images obtenues sur un cytomètre de flux FACSTAR (Marque déposée de Becton Dickinson) avec un colorant du type TO-PRO 3 (Marque déposée de  
35 Molecular Probes), sous irradiation à la lumière rouge.

Dans le cas de la figure 4A (colorant de référence), le temps d'incubation est de 30 minutes et le taux de réticulocytes de 4,1%.

- 5 Dans le cas de la figure 4B, le temps d'incubation est de 2 minutes et le taux de réticulocytes de 4,9%.

10 Les images précédentes montrent que l'utilisation d'un réactif de coloration selon l'invention permet de diminuer significativement le temps d'incubation par rapport à l'utilisation d'un colorant de référence.

Revendications

1. Réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, du type comprenant un colorant propre à marquer les cellules après incubation,

caractérisé en ce qu'il comprend en outre un additif propre à favoriser la pénétration du colorant dans les cellules, cet additif étant choisi parmi un composé ionophore, un détergent et leurs mélanges.

2. Réactif de coloration selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'additif comprend un composé ionophore.

3. Réactif de coloration selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'additif comprend un détergent.

4. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'additif comprend un mélange d'un composé ionophore et d'un détergent.

5. Réactif selon l'une des revendications 1, 2 et 4, caractérisé en ce que le composé ionophore est un protonophore ou un antibiotique choisi parmi :

- Monensine ou acide 2-[5-éthyltétrahydro-5-[tétrahydro-3-méthyl-5-[tétrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxyméthyl)-3,5-diméthyl-2H-pyran-2-yl]-2-furyl]-2-furyl]-9-hydroxy- $\beta$ -méthoxy- $\alpha$ - $\gamma$ ,2,8-tétraméthyl-1,6-dioxaspiro[4,5]décane-7-butyrique;

- Nonactine ou 2,5,11,14,20,23,29,32-octaméthyl-4,13,22,31,37,38,39,40-octaoxapentacyclo[32.2.1.1<sup>7,10</sup>.1<sup>16,19</sup>.1<sup>25,28</sup>]-tétracontane-3,12,21,30-tétrone;

- 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-benzylidènemalononitrile;

- Carbonylcyanide m-chlorophénylhydrazone;

- Carbonylcyanide p-trifluorométhoxyphénylhydrazone;
  - Tétrachlorosalicylanilide;
  - 5 - 4,5,6,7-tétrachloro-2-trifluorométhylbenzimidazole;
  - Pentachlorophénol;
  - 2,4-dinitrophénol;
  - 10 - Valinomycine;
  - Salinomycine;
  - 15 - Gramicidine(S).
6. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1, 3 et 4, caractérisé en ce que le détergent est du type non-ionique ou zwitterionique et choisi parmi :
- 20 - des propane sulfonates, en particulier le 3-[(3-cholamido-propyl)-diméthylammonio]-1-propane-sulfonate;
  - des cholamides, en particulier le N,N-bis[3-D-gluconamido-propyl]-cholamide;
  - 25 - des sulfobétaïnes;
  - des alkyl glucosides et alkyl maltosides;
  - 30 - des polyoxyéthylène éthers;
  - des polyoxyéthylène sorbitans;
  - 35 - des polyglycol éthers.
7. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le colorant est du type fluorescent.

8. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le colorant est excitable à une longueur d'onde comprise entre 0,1 nm et 1 mm.
- 5 9. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le colorant est excitable à la lumière bleue, en particulier à une longueur d'onde de 488 nm.
- 10 10. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le colorant est choisi parmi les suivants :
- 15 - le 3,3'-diméthylloxacarbocyanine iodure (ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2(3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure);
- 20 - le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate;
- le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonio)propyl], diiodure;
- 25 - des styryls, en particulier le styryl 7;
- le nouveau bleu de méthylène;
- le bleu de crésyl brillant.
- 30 11. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un composé choisi parmi les suivants :
- 35 - un sel, en particulier de sodium ou de potassium,
- un agent chélateur, en particulier l'EDTA,
- un solvant, en particulier un alcool,



- un conservateur, et

- un système tampon maintenant le pH entre 5 et 11.

5 12. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par la composition suivante :

- un colorant à une concentration comprise entre 0,1  $\mu$ M et 0,5 M

10

- au moins un additif choisi ci-dessous

	<u>Composés</u>	<u>Concentrations</u>
15	Ionophore	0-1 M
	Détergent	0-20%

- un ou plusieurs des composés énumérés ci-dessous :

20	<u>Composés</u>	<u>Concentrations</u>
	Sels (NaCl/KCl)	0-1 M
	Agent chélateur (EDTA)	0-100 mM
	Solvant	0-15%
25	Conservateur	0-1%

- un système tampon organique ou inorganique maintenant le pH entre 5 et 11.

1/4

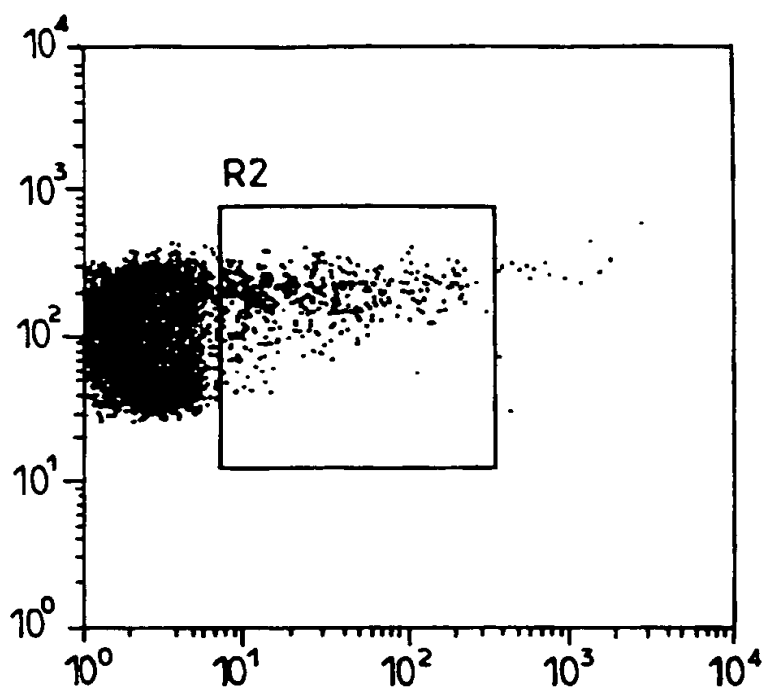


FIG.1A

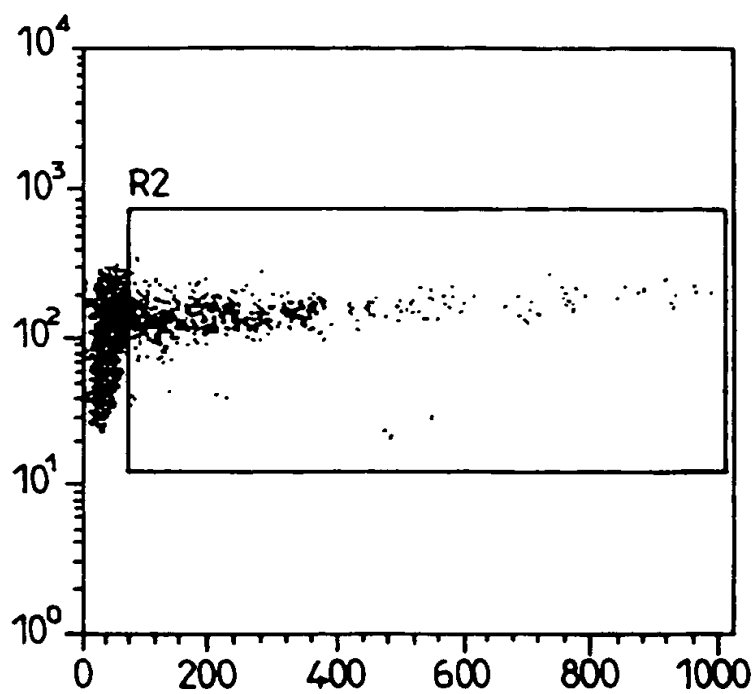


FIG.1B

2/4

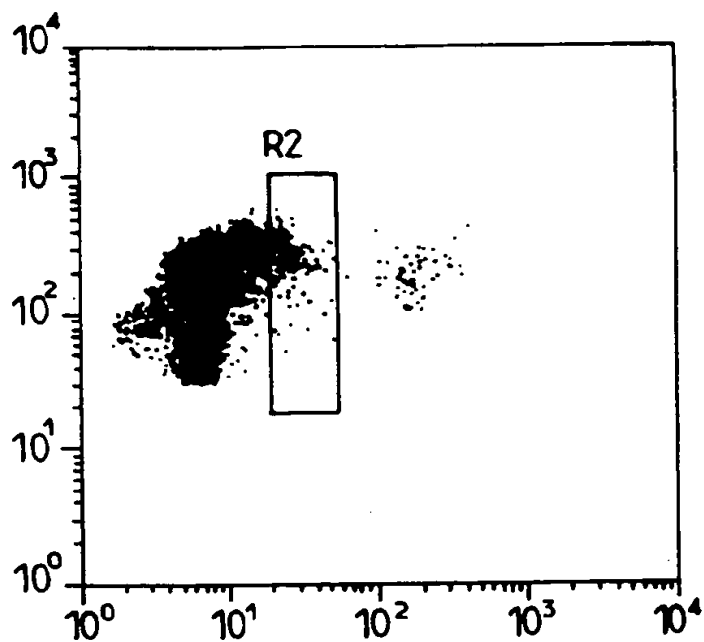


FIG.2A

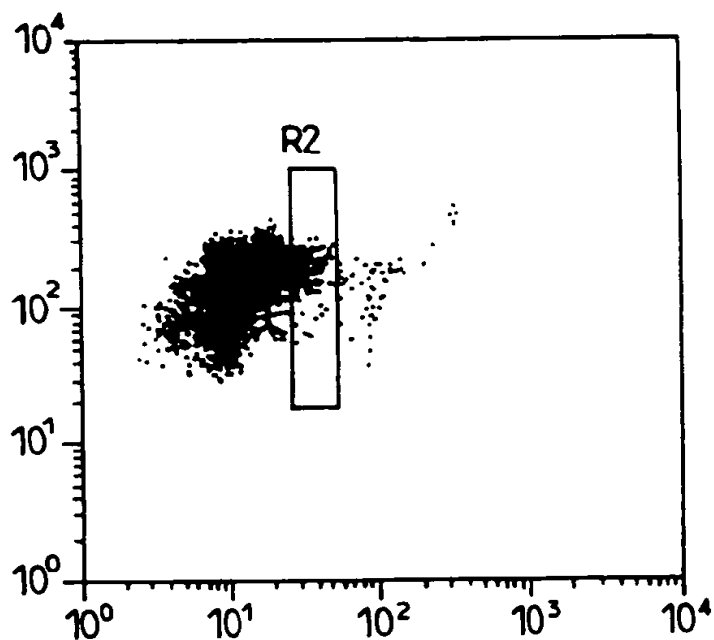


FIG.2B

3/4

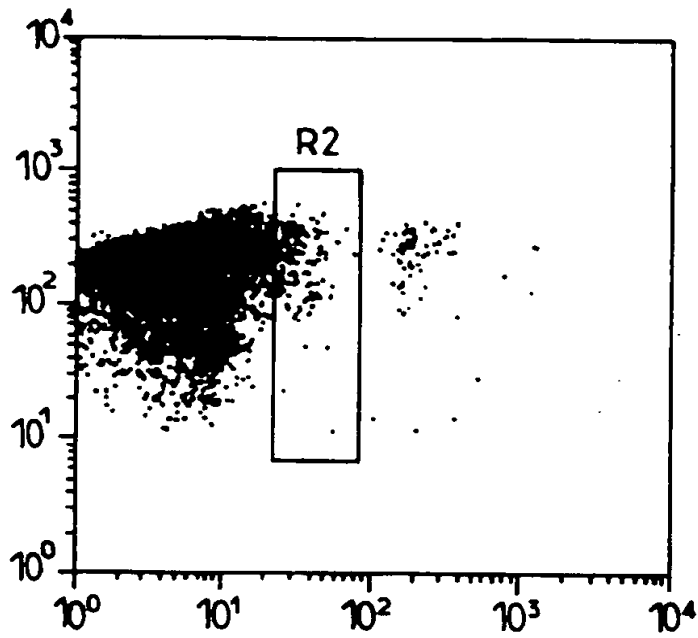


FIG. 3A

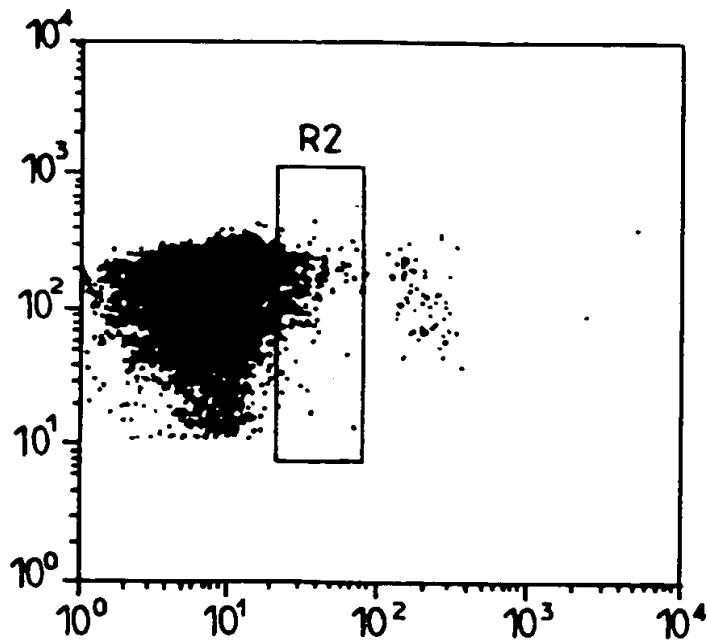


FIG. 3B

4/4

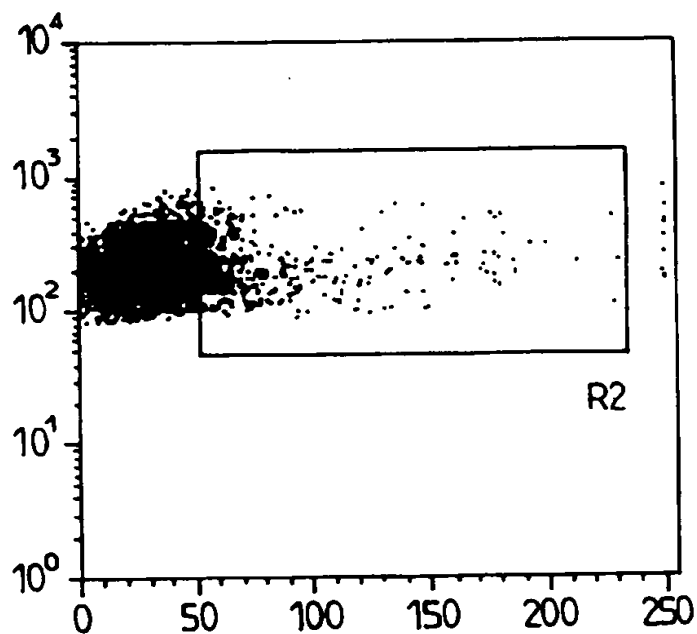


FIG. 4A

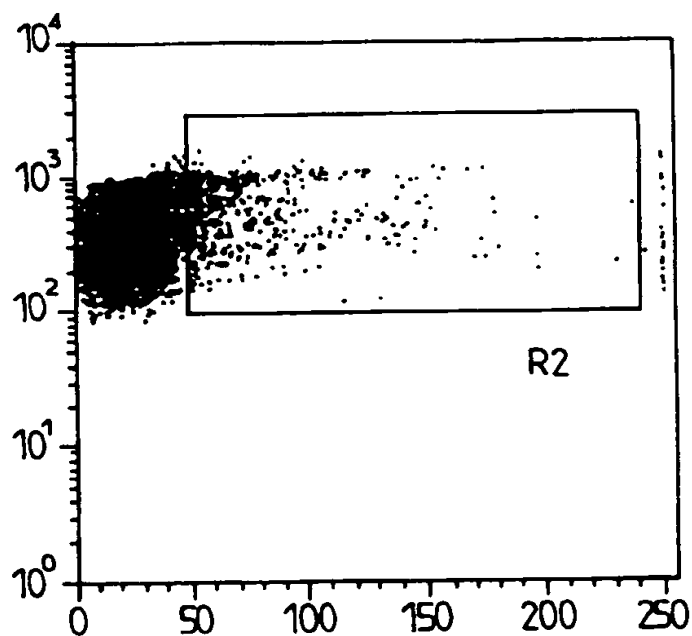


FIG. 4B

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2759166

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 538957  
FR 9701090

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 4 670 402 A (FLEGLER KARL-HEINZ) * le document en entier * ---	1-4,7
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8622 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 86-142078 XP002044489 & JP 61 079 163 A (TOA IYO DENSHI KK) , 22 avril 1986 * abrégé * ---	1,3
D,A	EP 0 545 315 A (MILES INC ;SINAI SCHOOL MEDICINE (US)) * le document en entier * ---	1
D,A	EP 0 430 719 A (TECHNICON INSTR) * le document en entier * ---	1
D,A	EP 0 226 272 A (BECTON DICKINSON CO) * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
24 octobre 1997		Moreno, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)